

УДК 541.64:537.363

© 1990 г. А. Н. Семенов, А. В. Субботин

**ОРИЕНТАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ В ДНК
ПРИ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЭЗЕ**

Проведены расчеты параметра ориентационного порядка макромолекулы ДНК при гель-электрофорезе в импульсном поле на основе рептационного уравнения движения в поле и с учетом напряжений, возникающих в движущейся цепи.

Движение макромолекул в геле хорошо описывается в рамках классической рептационной модели [1]. Для изучения поведения заряженной ДНК в геле во внешнем электрическом поле эту модель следует модифицировать, что было сделано в работах [2–4]. Однако указанные теории не учитывали жесткости ДНК и справедливы лишь для достаточно крупнопористых гелей, у которых средний размер пор λ больше сегмента Куна ДНК, $\lambda(\lambda > l)$.

В настоящей работе будут рассмотрены ориентационные эффекты при электрофорезе ДНК в мелкопористом геле ($\lambda \leq l$). Ориентация цепи характеризуется ориентационным параметром порядка $\eta = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle$

(θ – угол между направлением поля E (ось x) и локальной осью двойной спирали), который может быть измерен экспериментально по спектру кругового дихроизма. В силу отрицательного заряда ДНК, плотность которого $\sigma < 0$, движение цепи происходит против направления поля.

Для вычисления параметра порядка необходимо знать функцию распределения ориентации цепи $f(s, n, t)$ (величина $f(s, n, t) \Delta \Omega_n$ является вероятностью того, что направление главной оси спирали ДНК $n(s)$ в точке s в момент времени t находится в окрестности вектора n , $n^2=1$, в телесном угле $\Delta \Omega_n$). Уравнение для функции распределения в пренебрежении дальними корреляциями вдоль цепи можно записать в виде [5]

$$\frac{1}{D} \frac{\partial f}{\partial t} = \frac{\partial^2 f}{\partial s^2} - \frac{\sigma EP_x(t)}{kT} \frac{\partial f}{\partial s} \quad (1)$$

с граничными условиями

$$\begin{aligned} \frac{\partial f}{\partial s} + \frac{1}{l} \Delta_n f + \frac{\gamma}{l} \sin \theta \frac{\partial f}{\partial \theta} + \frac{2\gamma}{l} \cos \theta \cdot f &= 0, & s=0 \\ \frac{\partial f}{\partial s} - \frac{1}{l} \Delta_n f + \frac{\gamma}{l} \sin \theta \frac{\partial f}{\partial \theta} + \frac{2\gamma}{l} \cos \theta \cdot f &= 0, & s=L \end{aligned} \quad (2)$$

Здесь D – коэффициент диффузии вдоль контура, $P_x(t)$ – усредненное по конформациям расстояние между концами цепи в момент времени t , $\gamma = \sigma E \lambda^2 / kT$, k – постоянная Больцмана, T – температура, L – контурная длина цепи. Область применимости уравнения (1) должна быть определена из того условия, что среднее расстояние $P_x(t)$ больше флюктуационного $\Delta P_x \sim (Ll)^{1/2}$.

Наиболее простой случай соответствует стационарному движению ($\partial f / \partial t = 0$) без учета диффузии, т. е. движению путем дрейфа в поле. Тогда

функция распределения имеет вид

$$f(\mathbf{n}) = \frac{\gamma}{4\pi} \frac{\exp(\gamma \cos \theta)}{sh \gamma} \quad (3)$$

При получении формулы (3) предполагалось, что цепь «вытекает» через конец с координатой $s=0$.

Усредненный по конформациям параметр порядка цепи выражается как

$$\bar{\eta} = 1 + \frac{3}{\gamma^2} - \frac{3}{\gamma} \operatorname{cth} \gamma \quad (4)$$

При $\gamma \ll 1$ или $E \ll E' = \frac{kT}{\sigma \lambda^2}$, $\bar{\eta} = \frac{2}{15} \gamma^2$, $P_z = \frac{1}{3} \gamma L$. Отсюда нетрудно видеть, что область применимости уравнения (1) ограничена полями $E > E'' = \frac{kT}{\sigma \lambda^2} \left(\frac{l}{L} \right)^{\frac{1}{2}}$.

Если рассмотреть одиночную цепь, то в силу случайного характера движения ее конформация будет флюктуировать, следовательно, флюктуировать будет и параметр порядка цепи. При $\gamma \ll 1$ флюктуация параметра порядка $\Delta \eta \sim (l/L)^{\frac{1}{2}}$. Сравнивая это значение со средним параметром порядка в поле легко видеть, что при $\gamma^2 < (l/L)^{\frac{1}{2}}$ или $E < E' = \frac{kT'}{\sigma \lambda^2} \left(\frac{l}{L} \right)^{\frac{1}{2}}$

флюктуации являются сильными и параметр порядка цепи является недостоверным. В экспериментах по электрофорезу, как правило, имеют дело с ансамблем из $N \gg 1$ цепей, так что в этом случае следует проводить дополнительное усреднение по ансамблю, что приводит к гораздо меньшим флюктуациям, $\Delta \eta \sim \frac{1}{\sqrt{N}} \left(\frac{l}{L} \right)^{\frac{1}{2}}$ и средний параметр порядка можно экспериментально измерить при $E < E'$.

Учтем влияние диффузии на ориентацию при стационарном движении. Предполагая, что на больших временах диффузия является слабой и используя в основном приближение $P_z = \frac{1}{3} \gamma L$, функцию распределения при $\gamma \ll 1$ можно записать в виде разложения

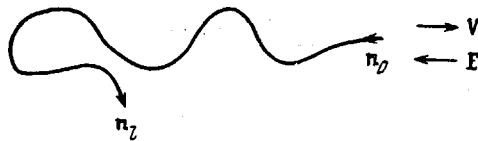
$$f(s, \mathbf{n}) = \frac{1}{4\pi} + \frac{\gamma}{4\pi} \left[1 - \frac{4 \exp\left(-\frac{\gamma^2}{3} \frac{L(L-s)}{\lambda^2}\right)}{2 + \gamma^2 L / 3l} \right] \cos \theta + \\ + \frac{\gamma^2}{24\pi} \left[1 - \frac{4\gamma^2 L}{l} \frac{\exp\left(-\frac{\gamma^2}{3} \frac{L(L-s)}{\lambda^2}\right)}{(2 + \gamma^2 L / 3l)(6 + \gamma^2 L / 3l)} \right] (3 \cos^2 \theta - 1) + O(\gamma^3) \quad (5)$$

В силу условия $E > E''$ предположение о малости диффузационной поправки справедливо. Средний параметр порядка цепи равен

$$\bar{\eta} = \frac{2\gamma^2}{15} \left(1 - \frac{l}{L} \frac{12}{(2 + \gamma^2 L / 3l)(6 + \gamma^2 L / 3l)} \right) \quad (6)$$

Диффузия приводит к частичной разориентации цепи, что связано с тем фактом, что цепь в силу броуновского характера движения может частично двигаться против поля и вытекать через конец с координатой $s=L$, ориентируя его в направлении, противоположном ориентации конца

с $s=0$, как показано ниже.



Рассмотрим нестационарное движение цепи при действии импульса поля, когда величина напряженности поля в импульсе $E \gg E^*$. В силу малости диффузационной поправки, в дальнейшем диффузией будем пренебречь. Пусть в момент времени $t=0$ цепь находилась в состоянии слу-

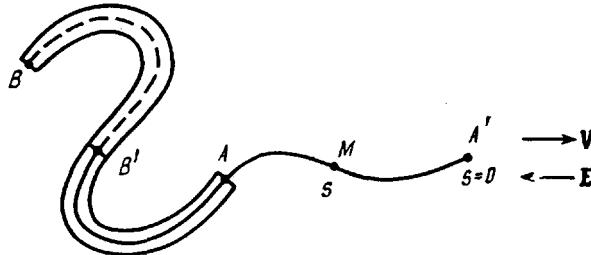


Рис. 1. Конформация цепи при действии импульса поля. AB – исходная трубка, в которой находилась цепь в момент времени $t=0$. $A'B'$ – трубка, занимаемая цепью в момент времени t . Контурная длина вышедшего участка $|AA'| = x(t)$. Средняя ориентация участка BA равна нулю, ориентация (AA') – δ

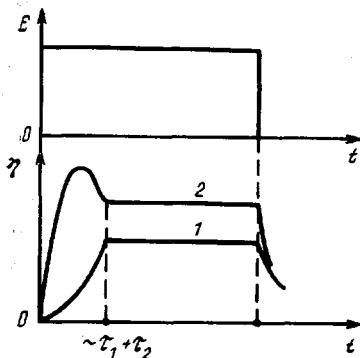


Рис. 2

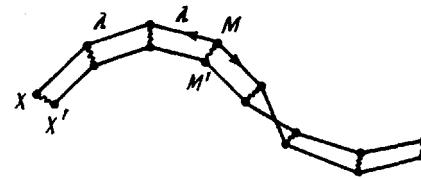


Рис. 3

Рис. 2. Качественная зависимость ориентационного параметра порядка цепи при действии импульса поля. Кривая 1 – расчет по формулам (4), (9)–(11), кривая 2 – эксперимент [7]

Рис. 3. Изменение конформации цепи при ее натяжении в результате деформации геля. X – исходная цепь, X' – деформированная

чайного гауссова клубка ($f(s, n, t=0) = 1/\pi$). Тогда действие импульса поля приведет к тому, что цепь начнет вытекать из исходной трубки и ориентироваться вдоль поля. К моменту времени t , меньшему времени выхода цепи из трубы, конформация макромолекулы состоит из двух частей: ориентированной (AA') и неориентированной (BB') (рис. 1). В начальные моменты времени скорость выхода будет определяться флюктуационным расстоянием ΔP_x и в среднем равна $\bar{v} = \sigma E D (Ll)^{1/2} / \sqrt{3} kT$. После того, как цепь выйдет на длину $x > x^* = (Ll)^{1/2} / \gamma \left(\left(\frac{l}{L} \right)^{1/2} \ll \gamma \ll 1 \right)$, расстоя-

ние P_x будет определяться величиной $x : P_x = \frac{1}{3} \gamma x$. Время, за которое цепь вытекает на контурную длину x , есть $\tau_1 \sim \lambda^2 / D\delta^2$, где $\delta = \gamma/3$. При $t > \tau_1$ уравнение на величину вышедшего из исходной трубы участка цепи

$x(t)$ имеет вид

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{\sigma ED\delta x}{kT} \quad (7)$$

Уравнение (7) легко решается

$$x(t) = \frac{(Ll)^{\frac{1}{2}}}{\delta} \exp \left[\frac{\sigma ED\delta(t-\tau_1)}{kT} \right] \quad (8)$$

При $\tau_2=t-\tau_1=\frac{1}{3}\frac{\lambda^2}{D\delta^2}\ln\left[\delta\left(\frac{L}{l}\right)^{\frac{1}{2}}\right]$, $x(\tau_1+\tau_2)=L$, что соответствует

полному выходу цепи из начальной трубки. Очевидно, что при $E \gg E^*$ время выхода будет полностью определяться временем τ_2 . Средний параметр порядка цепи при $E \ll E^*$, $\tau_1 < t \leq \tau_2$ описывается выражением

$$\bar{\eta}(t) = \frac{2}{5} \gamma \left(\frac{l}{L} \right)^{\frac{1}{2}} \exp \left[\frac{\gamma^2 Dt}{3\lambda^2} \right] \quad (9)$$

После прекращения действия импульса поля цепь релаксирует к начальному состоянию. Зависимость параметра порядка цепи от времени в процессе релаксации была рассмотрена в работе одного из авторов [6]. При временах $t < \tau_D$, $\tau_D \approx L^2/D$ — время обновления трубки путем диффузии, параметр порядка спадает со временем по степенному закону

$$\bar{\eta}(t) = \frac{2\gamma^2}{15} \left[1 - \frac{4}{\sqrt{\pi}} \left(\frac{Dt}{L^2} \right)^{\frac{1}{2}} \right], \quad (10)$$

а при $t > \tau_D$ закон становится экспоненциальным

$$\bar{\eta}(t) = \frac{16\gamma^2}{15} \exp \left(-\frac{\pi^2 Dt}{L^2} \right) \quad (11)$$

Качественная зависимость параметра порядка от времени при действии импульса поля показана на рис. 2 (кривая 1). В начальные моменты времени параметр порядка экспоненциальным образом стремится к стационарному значению, а в первые моменты после прекращения действия импульса поля спадает степенным образом. Следует заметить, что контурная длина L влияет только на время достижения стационарного движения и время релаксации цепи и не влияет на абсолютную величину параметра порядка.

Результаты последних экспериментов по ориентации ДНК при гель-электрофорезе свидетельствуют о качественно ином поведении параметра порядка при действии поля [7, 8]. Основные результаты экспериментов сводятся к следующему (качественная зависимость параметра порядка от времени при действии импульса поля изображена на рис. 2, кривая 2). Параметр порядка цепи до выхода на стационарное значение проходит через максимум, величина которого зависит от напряженности поля E и от контурной длины L ; значение параметра порядка на стационаре также зависит от E и контурной длины цепи и для мелкопористого полиакриламида геля растет примерно как L^1 [8]; после прекращения действия поля параметр порядка быстро падает, что не согласуется со степенным характером, полученным теоретически.

Для объяснения расхождения теории и эксперимента заметим, что при движении во внешнем поле электростатическая сила и сила трения в произвольной точке цепи не балансируют друг друга, что приводит к появлению натяжения в цепи. В зависимости от конформации цепи натяжение может быть как растягивающим, так и сжимающим. Натяжение в свою очередь ведет к деформации геля, а следовательно, и к изменению исходной конформации и параметра порядка. Рассмотрим раздельно случай стационарного и нестационарного движения цепи.

Если цепь движется стационарно, то натяжение носит флюктуационный характер и в среднем в произвольной точке s равно нулю, $\langle T(s) \rangle = 0$.

Это означает, что в каждой точке цепи с равной вероятностью может происходить растяжение и сжатие. Абсолютная величина натяжения определяется флюктуацией Δ размеров цепи вдоль поля. При $\gamma \ll 1$, $\Delta \sim (Ll)^{\frac{1}{2}}$ и по порядку величины натяжение $T_{\phi} \sim \sigma E (Ll)^{\frac{1}{2}}$. Средний квадрат натяжения в точке s при $E \ll E^*$

$$\langle T^2(s) \rangle = (\sigma E)^2 \frac{s(L-s)}{3L} \quad (12)$$

Если поле является достаточно сильным, т. е. при $E > E^*$, величина флюктуаций уменьшается, $\Delta \sim (Ll/\gamma^3)^{\frac{1}{2}}$, и

$$T_{\phi} \sim \left(\frac{kT}{\lambda^2} \right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{Ll}{\sigma E} \right)^{\frac{1}{2}}.$$

Рассмотрим случай нестационарного движения цепи, причем часть цепи находится в состоянии случайного клубка, а другая часть контурной длины x ориентирована со средней ориентацией δ . В этом случае среднее натяжение в цепи отлично от нуля и является растягивающим. В произвольной точке M цепи (рис. 1), имеющей координату s , оно равно

$$\bar{T}_M = \begin{cases} \sigma E \delta \frac{s(L-x)}{L}, & s \leq x \\ \sigma E \delta \frac{x(L-s)}{L}, & s > x \end{cases} \quad (13)$$

Средняя ориентация $\delta = \operatorname{ctg} \gamma - 1/\gamma$. Полагая $x \sim L/2$ легко видеть, что $\bar{T} \propto E^2 L^1$ при $E < E^*$ и $\bar{T} \propto E^1 L^1$ при $E > E^*$. Для флюктуационного натяжения было получено, что при $E < E^*$, $T_{\phi} \propto E^1 L^{\frac{1}{2}}$ и при $E > E^*$, $T_{\phi} \propto E^{-\frac{1}{2}} L^{\frac{1}{2}}$. Таким образом, при $E < E^*$ определяющим является флюктуационное натяжение, тогда как при $E > E^*$ наиболее сильное натяжение возникает в нестационарно движущейся цепи.

Чтобы найти параметр порядка с учетом натяжения, необходимо сделать некоторые предположения относительно упругих свойств геля. Будем полагать, что гель является изотропно деформируемым, так что абсолютная величина деформации подчиняется линейному закону, $\epsilon = -T/\sigma$, где параметр ϵ характеризует упругость геля, T – натяжение. Это предположение неверно для слишком больших растяжений, которые могут иметь место в достаточно сильных полях и для очень длинных цепей. В силу сказанного будем рассматривать только те случаи, когда справедлив линейный закон упругости.

Рассмотрим следующую модель (рис. 3). Предположим, что упругость геля сосредоточена в отдельных точках зацепления цепи за гель, причем расстояние между двумя соседними по цепи точками зацепления равно λ . Основываясь на этой модели, в приближении линейной упругости для параметра порядка были получены такие результаты. Если цепь движется стационарно и имеет среднюю ориентацию $\delta \ll 1$, то параметр порядка в точке s цепи равен

$$\eta(s) \approx 0,6\delta^2 + 0,2\tau\delta \left(\frac{L-2s}{L} \right) + 2,8\tau^2\delta^2 \left(\frac{s(L-s)}{L\lambda} \right) \quad (14)$$

Средний параметр порядка цепи

$$\bar{\eta} \approx 0,6\delta^2 + 0,5\tau^2\delta^2 \left(\frac{L}{\lambda} \right), \quad (15)$$

где $\tau = \sigma E / \epsilon$. Формулы (14) и (15) справедливы при $E < E'' = \frac{\epsilon}{\sigma} \left(\frac{\lambda}{L} \right)^{\frac{1}{2}}$,

численные постоянные определены в главном приближении. В выражении (15) второй член связан с флюктуационным натяжением и приводит

к линейному росту параметра порядка от контурной длины цепи, что наблюдалось в эксперименте [8].

Рассмотрим случай нестационарного движения, когда на цепь действует дополнительная растягивающая сила. Если к моменту времени t цепь вытекла из исходной трубки на контурную длину $x(t)$, то параметр порядка в точке s цепи равен

$$\bar{\eta}^*(s) \approx \begin{cases} 0, & s > x(t) \\ 0,6\delta^2 + 0,2\tau\delta \left(\frac{L-2s}{L} \right) + 2,4\tau\delta^3 \left(\frac{s(L-x)}{L\lambda} \right) + \\ + 2,8\tau^2\delta^2 \left(\frac{s(L-s)}{L\lambda} \right), & s < x(t) \end{cases} \quad (16)$$

Средний параметр порядка имеет вид

$$\bar{\eta}^* \approx 0,6\delta^2 \left(\frac{x}{L} \right) + 0,2\tau\delta \left(\frac{x(L-x)}{L^2} \right) + \\ + 1,2\tau\delta^3 \left(\frac{x^2(L-x)}{L^2\lambda} \right) + 0,5\tau^2\delta^2 \left(\frac{x^2(3L-2x)}{L^2\lambda} \right) \quad (17)$$

Как и следовало ожидать, нестационарный характер движения цепи приводит к дополнительному вкладу в параметр порядка.

Выражения для среднего параметра порядка цепи (15) и (17) справедливы лишь в слабых полях ($E < E'$) и их нельзя использовать в той области, в которой экспериментально исследовали зависимость параметра порядка от времени [7]. Однако можно дать качественное объяснение полученной экспериментально зависимости параметра порядка от времени при действии импульса поля (рис. 2, кривая 2). Пик на кривой связан с растягивающим натяжением, возникающим в начальные моменты времени до выхода цепи на стационарный режим движения; возрастание параметра порядка с увеличением контурной длины цепи при стационарном движении связано с флюктуационным натяжением цепи; после выключения поля флюктуационное натяжение быстро релаксирует, что отвечает за быстрый спад параметра порядка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doi M., Edwards S. F. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. II. 1978. V. 74, № 9. P. 1789.
2. Lumpkin O. J., Dejardin P., Zimm B. H. // Biopolymers. 1985. V. 24, № 11. P. 1573.
3. Slater G. W., Noolandi J. // Phys. Rev. Letters. 1985. V. 55, № 15. P. 1579.
4. Slater G. W., Noolandi J. // Biopolymers. 1986. V. 25, № 3. P. 431.
5. Семенов А. Н., Субботин А. В. // Высокомолек. соед. А. 1989. Т. 31, № 12. С. 2561.
6. Semenov A. N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. II. 1986. V. 82, № 3. P. 4317.
7. Holzwarth G., McKee C. B., Steiger S., Crater G. // Nucl. Acid. Res. 1987. V. 15, № 23. P. 10031.
8. Jonsson M., Akerman B., Norden B. // Biopolymers. 1988. V. 27, № 3. P. 381.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова
Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева АН ССР

Поступила в редакцию
14.04.89

A. N. Semenov, A. V. Subbotin

ORIENTATIONAL EFFECTS IN DEOXYRIBONUCLEIC ACID UNDER GEL-ELECTROPHORESIS

Summary

The orientational order parameter of the DNA macromolecule in the course of gel-electrophoresis in the impulse field has been calculated basing on the reptation motion equation in the field taking into account stresses arising in the moving chain.